

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

27.04.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 4月27日

RECD 26 JUN 2000

出願番号
Application Number:

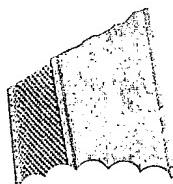
平成11年特許願第120747号

出願人
Applicant(s):

難波 正義
武田薬品工業株式会社

WFO

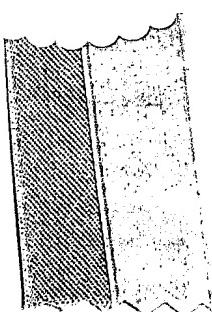
PCT



**PRIORITY
DOCUMENT**

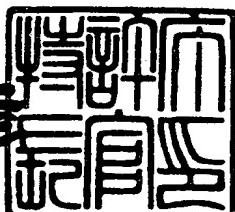
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月 9日



特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3042309

【書類名】 特許願
【整理番号】 A99089
【提出日】 平成11年 4月27日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 05/22
【発明の名称】 チトクロームP 4 5 0 を安定に発現するヒト細胞株
【請求項の数】 7
【発明者】
【住所又は居所】 岡山県岡山市宿400-1
【氏名】 難波 正義
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府豊中市上新田1丁目24番A-307号
【氏名】 朝日 知
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府大阪市旭区太子橋1丁目27番4号
【氏名】 吉富 純枝
【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県宝塚市山本丸橋2丁目11番地の5
【氏名】 池本 慶子
【特許出願人】
【住所又は居所】 岡山県岡山市宿400-1
【氏名又は名称】 難波 正義
【特許出願人】
【識別番号】 000002934
【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社
【代理人】
【識別番号】 100073955
【弁理士】
【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【弁理士】

【氏名又は名称】 内山 務

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【ブルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】チトクロームP450を安定に発現するヒト細胞株

【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒト型チトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌細胞由来の培養細胞株。

【請求項2】ヒト型チトクロームP450がCYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1またはCYP3A4を安定に発現する請求項1記載の細胞株。

【請求項3】ヒト肝臓癌細胞がHepG2である請求項1記載の細胞株。

【請求項4】請求項1記載の細胞株を用いることを特徴とする(a)生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素、(b)生体異物および／または内在性基質代謝経路、(c)生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造、(d)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害、(e)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進、(f)生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性、(g)生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性、(h)生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性、(i)生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性、(j)生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性、または(k)肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法。

【請求項5】請求項1記載の細胞株を用いることを特徴とする生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製方法。

【請求項6】請求項1記載の細胞株を用いることを特徴とする(a)生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質、(b)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質、(c)生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質、(d)生体異物および／または内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質、(e)生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質、(f)生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質、(g)生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性を発現する物質または(h)肝に作用する生体異物および／または内在性

基質の探索方法。

【請求項 7】 請求項 6 記載の方法を用いて得られる化合物またはその塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、

1. ヒト型チトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌細胞由来の細胞株、
2. 該細胞株を用いることを特徴とする(1) 生体異物および／または内在性基質代謝に関する酵素の解析方法、(2) 生体異物および／または内在性基質代謝経路の解析方法、(3)生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造の解析方法、(4) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製方法、(5) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害の解析方法、(6) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進の解析方法、(7) 生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の発現の解析方法、(8) 生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の発現の解析方法、(9) 薬物代謝による発ガン性発現の解析方法、(10) 生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の解析方法、(11) 生体異物および／または内在性基質代謝に肝毒性発現の解析方法、(12) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法、
3. 該細胞株を用いることを特徴とする(1) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質の探索方法、(2) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質の探索方法、(3)生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質の探索方法、(4) 生体異物および／または内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質の探索方法、(5) 生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質の探索方法、(6) 生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質の探索方法、(7)生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性発現をする物質の探索方法、(8) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の探索方法、
4. 該探索方法を用いて得られる化合物又はその塩等に関する。

【0002】

【従来の技術】

肝臓細胞は非常に多くの生理的機能を有しているが、なかでも薬物、食品添加物、環境汚染物質および化学工業製品などの生体異物および／または内在性基質の代謝に関して非常に重要な機能を果たしている。この生体異物および／または内在性基質の代謝の機能は同時に生体異物および／または内在性基質による生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害、生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進、生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の発現、生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の発現、生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性発現、生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の発現、生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性発現などをもたらす場合があり、非常に広く研究が進められている。ここでいう生体異物および／または内在性基質の代謝には多くの酵素が関与していることが知られている。この中にはUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ、スルフォトランスフェラーゼ、グルタチオントランスフェラーゼ、エポキシヒドラターゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、フラビンモノオキシゲナーゼおよびチトクロームP450などが含まれる。またチトクロームP450が、その酵素機能を発現するためにはチトクロームP450還元酵素の存在が必須である。これら酵素群の中で、生体異物および／または内在性基質の代謝に関してはチトクロームP450が最も重要な役割を果たしている。チトクロームP450は、非常に多くの分子種を含む酵素群の総称であり、ヒトの肝臓における生体異物および／または内在性基質の代謝においては、CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4の10種が特に重要だとされている。また、これらヒト肝臓に分布している酵素は個体差が大きいため、ヒトに由来する肝臓試料は、安定な試験系としては使用できない。一方、かかる肝臓の代謝機能には生物種により非常に強い特異性すなわち種差が存在し、ヒトにおける種々の代謝機能をラットなどの実験動物において予測することは困難である。しかしながらこれらの検討項目を実際のヒトで解析することは多くの場合不可能である。このような理由からヒト培養肝細胞は、実験動物の代替法として迅速かつ安価

かつ安全かつ正確にヒトにおける肝臓の機能を検討する方法をもたらすものばかりではなく肝臓の機能を代替するいわゆる人工肝臓作成を可能とするものと考えられている。しかしながら、生体組織から分離したヒト正常肝細胞は継代培養が不可能である。細胞株として樹立することのできる細胞は本来の分化形質を持たないことが多く、細胞株が本来属していた組織の機能を正確に反映するものではない場合が多い。特に肝細胞において生体異物および／または内在性基質の代謝を行う酵素群その中でも特にチトクロームP450分子種に属する酵素群は、初代培養に於いて極めて短時間でその活性を失い、株化細胞でその性質を十分に保持しているものはこれまで見いだされていない(J. Dich et.al., Hepatology, 8,39-45(1988))。このような観点から生体異物および／または内在性基質の代謝能を保持しつつ培養が可能な肝細胞がこれまで広く求められてきた。

しかしながら現在まで生体異物および／または内在性基質代謝に関与する機能を肝臓と同様に保持している培養細胞株は今まで得られていない。特にチトクロームP450の活性は細胞の培養化により急速に失われることは広く認知されているため、株化された培養細胞にチトクロームP450を安定に発現させこれをもって肝臓の代謝機能を代替させようとする試みはが従来実施してきた(M. Sawada et. al., Mutation Research 411, 19-43 (1998))。しかしながら先に述べた理由からチトクロームP450を発現させる細胞株はヒト肝細胞由来であることが必須でありまたチトクロームP450活性発現のためにNADPH チトクロームP450還元酵素の活性が必要でありさらに多くの酵素の発現が必要である。従って、ヒト肝の代謝機能を安定かつ安全に再現するにはその細胞がチトクロームP450のみならず種々の代謝に関与する酵素の活性を保持しているヒト培養肝細胞である必要がある。

代謝に関与する種々の酵素活性を保持した細胞にチトクロームP450発現した例としてはHepG2細胞にワクシニアウイルスを利用してP450を発現させた例(Methods in Enzymology, T. Aoyama et. al in Methods in Enzymology 260巻、85-92ページ M. R. Waterman 監修 Academic Press 1991年)およびHepG2細胞にCYP2E1を安定に発現させた例(Y.Dai et al,Biochemistry 32巻、6928-6937ページ 1993年)があげられる。前者は、その取り扱いに注意が必要であり実用上の障壁と

なっている。又後者については、単独にCYP2E1のみについての試みであり、肝に存在する多くのチトクロームP450についての試みは現在までではない。従って、肝における生体異物および／または内在性基質の代謝に関する酵素群を保持する培養細胞株を得ることができれば該細胞株を用いて(1) 生体異物および／または内在性基質代謝に関する酵素の解析、(2) 生体異物および／または内在性基質代謝経路の解析、(3) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造の解析、(4) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製、(5) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害の解析、(6) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進の解析、(7) 生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の発現の解析、(8) 生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の発現の解析、(9) 生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性発現の解析、(10) 生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の解析、(11) 生体異物および／または内在性基質代謝に肝毒性発現の解析、(12) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法等が可能になるばかりではなく、該細胞株を用いて(1) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質の探索、(2) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質の探索、(3) 生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質の探索、(4) 生体異物および／または内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質の探索、(5) 生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質の探索、(6) 生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質の探索、(7) 生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性発現をする物質の探索、(8) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の探索等が可能となり該解析方法および／または該探索方法を用いて特定の化合物又はその塩等が得られる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、ヒト肝臓に由来する培養細胞株の提供であり、ヒト型チトクロームP450 CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 を安定に発現する細胞株を分離製造することにある。これら細胞は(1) 生体異物および／

または内在性基質代謝に関する酵素の解析、(2) 生体異物および／または内在性基質代謝経路の解析、(3) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造の解析、(4) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製、(5) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害の解析、(6) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進の解析、(7) 生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の発現の解析、(8) 生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の発現の解析、(9) 生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性発現の解析、(10) 生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の解析、(11) 生体異物および／または内在性基質代謝に肝毒性発現の解析、(12) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析等を可能とするばかりではなく、(1) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質の探索、(2) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質の探索、(3) 生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質の探索、(4) 生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性を発現する物質の探索、(5) 生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質の探索、(6) 生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質の探索、(7) 生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性発現をする物質の探索、(8) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の探索等を可能とし該解析方法および／または該スクリーニング方法を用いて特定の化合物又はその塩等が得ることを可能とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題に鑑み、銳意研究を重ねた結果、ヒト肝臓癌由来細胞株において、安定にヒト生体異物および／または内在性基質代謝に関するチトクロームP450を安定かつ高活性で発現する安定形質転換株を樹立し、さらに研究を行った結果、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、

- (1) ヒト型チトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の細胞株、

- (2) ヒト型チトクロームP450がCYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CY
P2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1またはCYP3A4を安定に発現する上記(1)記載
の細胞株、
- (3) ヒト肝臓癌細胞がHepG2である上記(1)記載の培養細胞株、
- (4) 上記(1)記載の細胞株を用いることを特徴とする(a)生体異物および／
または内在性基質代謝に関与する酵素、(b)生体異物および／または内在性基質
代謝経路、(c)生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造、(d)生体
異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害、(e)生体異物および／または内
在性基質代謝酵素の活性の促進、(f)生体異物および／または内在性基質代謝に
による細胞毒性、(g)生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性、(h)
生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性、(i)生体異物および／
または内在性基質代謝による変異原性、(j)生体異物および／または内在性基質
代謝による肝毒性、または(k)肝に作用する生体異物および／または内在性基質
の解析方法、
- (5) 上記(1)記載の細胞株を用いることを特徴とする生体異物および／または
内在性基質代謝産物の調製方法、
- (6) 上記(1)記載の細胞株を用いることを特徴とする(a)生体異物および／
または内在性基質代謝酵素を阻害する物質、(b)生体異物および／または内在性
基質代謝酵素の活性を促進する物質、(c)生体異物および／または内在性基質代
謝により細胞毒性を発現する物質、(d)生体異物および／または内在性基質代
謝により遺伝毒性を発現する物質、(e)生体異物および／または内在性基質代
謝により発ガン性を発現する物質、(f)生体異物および／または内在性基質代
謝により変異原性を発現する物質、(g)生体異物および／または内在性基質代
謝により肝毒性を発現する物質または(h)肝に作用する生体異物および／または内在性基質
の探索方法、および
- (7) 上記(6)記載の方法を用いて得られる化合物またはその塩などに関する

【0006】

【発明の実施の形態】

本明細書中、生体異物とは、例えば薬物、食品添加物、環境汚染物質、化学製品全般などを意味し、内在性基質とは生体の中に存在するあらゆる物質を意味する。中でも薬物を中心とする生体異物の代謝に対しては薬物代謝などが好ましく用いられる。

用いられるヒト肝臓癌細胞は、ヒト肝臓癌に由来する培養細胞株（好ましくは、HepG2）をヒト肝臓癌より分離して得ることができる。ここに、別途分離した種々のチトクロームP450をコードする遺伝子を安定に発現せしめる。チトクロームP450をコードするDNA断片を安定に発現せしめるには、例えば個々のチトクロームP450をコードするDNA断片を得、それを外来性のプロモーターの支配下に置き発現せしめる。チトクロームP450をコードするDNA断片の塩基配列は、公開されているデータベースより得ることができる。この塩基配列をもとによりPCR法、ハイブリダイゼーションスクリーニング法などの公知の方法によりチトクロームP450をコードDNA断片を分離することが可能である。このようにして得られたDNA断片は、哺乳類の培養細胞において安定に外来遺伝子を発現する形質転換株をもたらすベクターに導入し、形質転換用ベクターを作成する。作製したベクターは、公知の方法により肝癌細胞に導入される。形質転換株は、そのものに導入されたチトクロームP450の発現によりもたらされる酵素活性を検討することにより選択し、すぐれたクローンを選択する。さらに得られたクローンは、凍結保存の繰り返しによりその性質の安定性を確認できる。

外来性のプロモーターとしては、例えば、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

肝の生体異物およびまたは内在性基質代謝に関するチトクロームP450分子種としてはCYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4ができることができる。これらの酵素は、生体異物およびまたは内在性基質の代謝反応を行うばかりではなくその代謝産物の性状により生体異物およびまたは内在性基質代謝酵素の阻害、生体異物およびまたは内在性基質代

謝酵素の活性の促進、生体異物およびまたは内在性基質代謝による細胞毒性の発現、生体異物およびまたは内在性基質代謝による遺伝毒性の発現、生体異物およびまたは内在性基質代謝による発ガン性発現、生体異物およびまたは内在性基質代謝による変異原性発現、生体異物およびまたは内在性基質代謝による肝毒性発現等を生じせしめる。しかしながら、肝の生体異物およびまたは内在性基質代謝に関与する機能は、単にチトクロームP450のみにより実施されるのではなく UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ、スルフォトランスフェラーゼ、グルタチオントランスフェラーゼ、エポキシヒドラターゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、フラビンモノオキシゲナーゼおよびチトクロームP450還元酵素などの種々の酵素の共同の働きに依存する。

【0007】

従って、チトクロームP450の発現により肝の機能を再現せしめるためにはその細胞はヒト由来の少なくとも UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ、スルフォトランスフェラーゼ、グルタチオントランスフェラーゼ、エポキシヒドラターゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、フラビンモノオキシゲナーゼが機能している細胞でなくてはならない。このような細胞の一つとしてヒト肝臓癌由来の培養細胞HepG2があげられる。HepG2細胞は、 UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ、スルフォトランスフェラーゼ、グルタチオントランスフェラーゼ、エポキシヒドラターゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、フラビンモノオキシゲナーゼおよびNADPH P450還元酵素が機能していることが知られている(J. Rueff et al., Mutation Research, 353, 151-176 (1996))。以上の観点から、本発明者らはHepG2においてチトクロームP450を安定に発現せしめることにより迅速かつ安価かつ安全かつ正確にヒト肝臓の機能を再現せしめることに成功した。

なかでも、 Hepc/3A4.5、Hepc/2E1.3-8、Hepc/2C9.1、Hepc/2C8.46、Hepc/1A2.9、Hepc/1A1.4、Hepc/2B6.68、Hepc/2D6.39、Hepc/2A6L.9、Hepc/2C19.12などが好ましく用いられる。

【0008】

さらに本発明は、上記のヒト型チトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株を用いることを特徴とする(a) 生体異物および／または内

在性基質代謝に関する酵素の解析方法、(b) 生体異物および／または内在性基質代謝経路の解析方法、(c) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造の解析方法、(d) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製方法、(e) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害の解析方法、(f) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進の解析方法、(g) 生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の発現の解析方法、(h) 生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の発現の解析方法、(i) 生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性発現の解析方法、(j) 生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の解析方法、(k) 生体異物および／または内在性基質代謝に肝毒性発現の解析方法または(l) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法などに関する。以下に上記(a)～(l)記載の各方法について説明する。

【0009】

(a) 生体異物および／または内在性基質代謝に関する酵素の解析方法：

たとえば、被検物質のチトクローム p 450 を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株への暴露による生体異物および／または内在性基質の構造の変化を解析することにより生体異物および／または内在性基質代謝に関する酵素の解析が可能である(J.L. Napoli ほか Methods in Enzymology vol. 206 pp.491-501 Ed. by M.R. Waterman ほか Academic Press 1991、H. K. Kroemer ほか Methods in Enzymology vol. 272 pp.99-198 Ed. by M.R. Waterman ほか Academic Press 1996)。具体的には、被検物質のチトクローム p 450 を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株への暴露による生体異物および／または内在性基質の構造の変化を解析することによる生体異物および／または内在性基質代謝に関する酵素の同定、被検物質の細胞への暴露による生体異物および／または内在性基質の構造の変化を解析することによる酵素反応機構の解析、基質特異性の解析などをあげることができる。

被検物質としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であって

もよい。

(b) 生体異物および／または内在性基質代謝経路の解析方法：

たとえば、被検物質のチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株への暴露による生体異物および／または内在性基質の構造の変化を解析することにより生体異物および／または内在性基質の代謝経路の解析が可能である(J.L. Napoli ほか Methods in Enzymology vol. 206 pp.491-501 Ed. by M.R. WatermanほかAcademic Press 1991、H. K. Kroemer ほか Methods in Enzymology vol. 272 pp.99-198 Ed. by M.R. WatermanほかAcademic Press 1996)。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(c) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造の解析方法：

たとえば、被検物質のチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株への暴露により生じた生体異物および／または内在性基質の構造の変化を解析することにより生体異物および／または内在性基質の代謝産物の化学構造の解析が可能である(J. L. Napoli ほか Methods in Enzymology vol. 206 pp.491-501 Ed. by M.R. WatermanほかAcademic Press 1991、H. K. Kroemer ほか Methods in Enzymology vol. 272 pp.99-198 Ed. by M.R. WatermanほかAcademic Press 1996)。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

【0010】

(d) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製方法：

たとえば、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露せしめた結果生じた生体異物および／または内在性基質の変換物質（いわゆる代謝産物）を採取し適切な方法で精製分離することにより生体異物および／または内在性基質の代謝産物の調製が可能である(J.L. Napoli ほか Methods in Enzymology vol. 206 pp.491-501 Ed. by M.R. WatermanほかAcademic Press 1991)。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(e) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害の解析方法

たとえば、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株へ暴露することにより生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の阻害の解析が可能である(J.L. Napoli ほか Methods in Enzymology vol. 206 pp.491-501 Ed. by M.R. Watermanほか Academic Press 1991)。具体的には、チトクロームP450酵素活性の阻害、タンパク量の減少、mRNAの減少などにより検出することが可能である。検出方法としては、各種P450に対応する酵素活性の測定、各種P450蛋白質に対応するウエスタンブロティング、各種P450 mRNAに対応するノザンハイブリダイゼーションあるいはRT-PCR法など公知の手法を使用することができる。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(f) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進の解析方法：

たとえば、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株へ暴露し、生体異物および／または内在性基質代謝の酵素活性の上昇、酵素量の増加または酵素をコードする遺伝子の転写量の上昇などを検出することにより生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進の解析が可能である(J. Rueff ほか Mutation Research 353(1996) 151-176)。具体的には、チトクロームP450酵素活性の上昇、タンパク量の増加、mRNAの増加を検出することで可能である。検出方法としては、各種P450に対応する酵素活性の測定、各種P450蛋白質に対応するウエスタンブロティング、各種P450 mRNAに対応するノザンハイブリダイゼーションあるいはRT-PCR法など公知の手法を使用することができる。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

【0011】

(g) 生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の解析方法：

たとえば、被検物質のチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株への暴露により生体異物および／または内在性基質の代謝による細胞毒性の解析が可能である。具体的には、被検物質の暴露による細胞の形態の変化、MTTアッセイやトリパンブルー染色あるいはクリスタルバイオレット染色など公知の方法による生細胞数の変動、乳酸脱水素酵素などの細胞内酵素の漏出、細

胞表層構造の変化あるいは細胞内酵素の変動などを観察することにより解析される(D. Wu ほか *Journal of Biological Chemistry*, 271, (1996) 23914-23919)。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(h) 生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の解析方法：

たとえば、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露し、細胞を染色体異常試験、小核試験などに付すことにより生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の解析が可能である。またさらに、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露したのち、細胞により変化した被検物質を適切な評価系で評価することにより染色体異常試験、小核試験、復帰突然変異試験などに付すことにより解析が可能である(J. Rueff ほか *Mutation Research* 353(1996) 151-176, M. E. McManus ほか *Methods in Enzymology* vol. 206 pp.501-508 Ed. by M.R. Watermanほか *Academic Press* 1991))。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(i) 生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性の解析方法：

たとえば、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露し、細胞を染色体異常試験、DNAの修飾などに付すことにより生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性の解析が可能である。またさらに、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露したのち、細胞により変化した被検物質を適切な化学物質による発ガン評価系で評価することにより解析が可能である(J. Rueff ほか *Mutation Research* 353(1996) 151-176, K. Kawajiri ほか *Cytochromes P450 metabolic and toxicological aspects* pp.77-98 ed. by C. Ioannides CRC press (1996))。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(j) 生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の解析方法：

たとえば、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露し、細胞を染色体異常試験、小核試験などに付すことにより

生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の解析が可能である。またさらに、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露したのち、細胞により変化した被検物質を適切な評価系で評価することにより染色体異常試験、小核試験、復帰突然変異試験などに付すことにより解析が可能である(J. Rueff ほかMutation Research 353(1996) 151-176)。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(k) 生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性の解析方法：

たとえば、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露し、細胞毒性の発現を観察することにより、あるいは、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露したのち、細胞により変化した被検物質を他の肝細胞、肝切片、摘出肝または、実験動物へ投与しそれによる細胞、組織、生体の変化を観察することにより生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性を解析することが可能である。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(l) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法：

たとえば、被検物質のチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株への暴露による細胞の変化の発現を観察することにより、あるいは、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露したのち、細胞により変化した被検物質を他の肝細胞、肝切片、摘出肝または、実験動物へ投与しそれによる細胞、組織、生体の変化を観察することにより肝への作用の発現を解析することが可能である。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

【0012】

さらに本発明は、上記のヒト型チトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株を用いることを特徴とする(A)生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質、(B)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質、(C)生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質、(D)生体異物および／または内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質、(E)生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン

性を発現する物質、(F)生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質、(G)生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性発現をする物質または(H)肝に作用する生体異物および／または内在性基質の探索方法およびこれらの探索方法によって得られる化合物またはその塩を提供する。

(A)生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質の探索方法としては、上記(e)に記載の生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害の解析方法に従って解析し、例えば、チトクロームP450酵素活性の阻害、タンパク量の減少、mRNAの減少などをもたらす被検物質を生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質として選択することが可能である。

(B)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質の探索方法としては、上記(f)に記載の生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進の解析方法に従って解析し、例えば、チトクロームP450酵素活性の促進、タンパク量の増加、mRNAの増加などをもたらす被検物質を生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質として選択することが可能である。

(C)生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質の探索方法としては、上記(g)に記載の生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の解析方法に従って解析し、例えば、被検物質の暴露による細胞の形態の変化、生細胞数の変動、細胞内酵素の漏出、細胞表層構造の変化あるいは細胞内酵素の変動などをもたらす被検物質を生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質として選択することが可能である。

(D)生体異物および／または内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質の探索方法としては、上記(h)に記載の生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の解析方法に従って解析し、例えば、染色体異常試験、小核試験などに付すことより生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性をもたらす被検物質を生体異物および／または内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質として選択することが可能である。

(E)生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質の探索方法としては、上記(i)に記載の生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性の解析方法の従って解析し、例えば染色体異常試験、DNAの修飾など

に付すことにより生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性をもたらす被験物質を生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質として選択することが可能である。

(F) 生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質の探索方法としては、上記(j)に記載の生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の解析方法に従って解析し、例えば染色体異常試験、小核試験などに付すことにより生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性をもたらす被験物質を生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質として選択することが可能である。

(G) 生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性発現をする物質の探索方法としては、上記(k)に記載の生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性の解析方法に従って解析し、例えば、被検物質を細胞に暴露したのち、細胞により変化した被検物質を他の肝細胞、肝切片、摘出肝または、実験動物へ投与しそれによる細胞、組織、生体の変化を観察することにより生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性をもたらす被験物質を生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性発現をする物質として選択することが可能である。

(H) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の探索方法としては、上記(1)に記載の肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法に従がつて解析し、例えば、被検物質を細胞に暴露したのち、細胞により変化した被検物質を他の肝細胞、肝切片、摘出肝または、実験動物へ投与しそれによる細胞、組織、生体の変化を観察することにより肝に作用する生体異物および／または内在性基質を探索することが可能である。

【0013】

上記(A)～(H)の探索方法により得られる化合物またはその塩は、上記した作用・性質などをもたらす被験物質から選ばれた化合物またはその塩であり、肝臓の生体異物の代謝異常に係る疾患（例えば、肝機能不全症など）に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

該探索方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えは、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えは、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0014】

該探索方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、公知の製造法またはそれに準じた方法で製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えは、ヒトまたは哺乳動物（例えは、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えは、肝機能不全症の治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えは、肝機能不全症の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

上記の製剤の剤形としての具体例としては、例えは錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、カプセル剤（マイクロカプセルを含む）、顆粒剤、細粒剤、散剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、注射剤、吸入剤、軟膏などが用いられる。これらの製剤は常法（例えは日本薬局方記載の方法など）に従って調製される。

該製剤において、上記のスクリーニング方法で得られた化合物またはその塩の

含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常製剤全体に対して0.01ないし100重量%、好ましくは0.1ないし50重量%、さらに好ましくは0.5ないし20重量%程度である。

具体的には、錠剤の製造法は、医薬品をそのまま、賦形剤、結合剤、崩壊剤もしくはそのほかの適当な添加剤を加えて均等に混和したものを、適当な方法で顆粒とした後、滑沢剤などを加え、圧縮成型するかまたは、医薬品をそのまま、または賦形剤、結合剤、崩壊剤もしくはそのほかの適当な添加剤を加えて均等に混和したものを、直接圧縮成型して製するか、またはあらかじめ製した顆粒をそのまま、もしくは適当な添加剤を加えて均等に混合した後、圧縮成型しても製造することもできる。また、本剤は、必要に応じて着色剤、矯味剤などを加えることができる。さらに、本剤は、適当なコーティング剤で剤皮を施すこともできる。

注射剤の製造法は、医薬品の一定量を、水性溶剤の場合は注射用水、生理食塩水、リングル液など、非水性溶剤の場合は通常植物油などに溶解、懸濁もしくは乳化して一定量とするか、または医薬品の一定量をとり注射用の容器に密封して製することができる。

経口用製剤担体としては、例えばデンプン、マンニット、結晶セルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどの製剤分野において常用されている物質が用いられる。注射用担体としては、例えば蒸留水、生理食塩水、グルコース溶液、輸液剤などが用いられる。その他、製剤一般に用いられる添加剤を適宜添加することもできる。

【0015】

後述の実施例で得られた細胞株はHepc/3A4.5, Hepc/2E1.3-8, Hepc/2C9.1, Hepc/2C8.46, Hepc/1A2.9, Hepc/1A1.4は平成11年2月10日からおののの財団法人・発酵研究所(IF0)において、それぞれ寄託番号IF050502, 50503, 50504, 50505, 50506, 50507として寄託されている。Hepc/2B6.68, Hepc/2D6.39はそれぞれ平成11年2月15日から財団法人・発酵研究所(IF0)において寄託番号IF050508, 50509として寄託されている。また、Hepc/2A6L.9, Hepc/2C19.12はそれぞれ平成11年2月15日から財団法人・発酵研究所(IF0)において寄託番号IF050511, 50512として寄託されている。

【0016】

【実施例】

以下本発明の実施例について詳細に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。また、遺伝子操作の手法は特に断りのない限りサムブルーク(Sambrook)らのマニュアル(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ・プレス)などによる一般的な方法を用いた。

【0017】

実施例1：チトクロームP450をコードするDNA断片のクローン化および発現ベクターの作成

ヒトチトクロームP450をコードするDNA断片のクローン化はヒト成人肝臓に由来する相補DNA(cDNA)ライブラリーから、確立された方法であるpolymerase chain reaction(以下PCR)法によりクローン化した。クローン化するヒトチトクロームP450のcDNA配列はジーンバンク(GeneBank)のデータベースから入手可能である。GeneBankにおける受け入れ番号はCYP1A1はK03191、CYP1A2はM55053あるいはM38504、CYP2A6はM33318あるいはM33316、CYP2B6はM29874あるいはJ02864、CYP2C8はM17397あるいはJ03472、CYP2C9はM61857あるいはJ05326、CYP2C19はM61854あるいはJ05326、CYP2D6はX08006あるいはY00300、CYP2E1はJ02625、CYP3A4はJ04449となっている。

クローン化した個々のcDNAは、pcDNA3.1(+)ベクター(Invitrogen Co.) CMV サイトメガロウイルスのエンハンサー・プロモーターの下流にプロモーターの機能する方向に合わせて導入しCYP1A1を導入した1A1/pcDNA3.1(+)、CYP1A2を導入した1A2/pcDNA3.1(+)、CYP2A6を導入した2A6/pcDNA3.1(+)、CYP2B6を導入した2B6/pcDNA3.1(+)、CYP2C8を導入した2C8/pcDNA3.1(+)、CYP2C9を導入した2C9/pcDNA3.1(+)、CYP2C19を導入した2C19/pcDNA3.1(+)、CYP2D6を導入した2D6/pcDNA3.1(+)、CYP2E1を導入した2E1/pcDNA3.1(+)、CYP3A4を導入した3A4/pcDNA3.1(+)を得た。

【0018】

実施例2：チトクロームP450高活性発現細胞の選択

HepG2 は、10% FCS (牛胎児血清 fetal calf serum) (Bio Whittaker)を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) 培地で維持した。HepG2 を60mm ディッシュに播種し、50~60%コンフルエントになるまでCO₂ インキュベーター 内で培養した後、リポフェクタミン試薬 (GIBCO BRL) を用いて2μgの1A1/pcDNA 3.1(+)、1A2/pcDNA3.1(+)、2A6/pcDNA3.1(+)、2B6/pcDNA3.1(+)、2C8/pcDNA3. 1(+)、2C9/pcDNA3.1(+)、2C19/pcDNA3.1(+)、2D6/pcDNA3.1(+)、2E1/pcDNA3.1(+)、あるいは3A4/pcDNA3.1(+)をトランスフェクトした。2日間10% FCSを含むDM EM培地で培養後、500μg/ml G418 (GIBCO BRL)、10% FCSを含むDMEM培地に置換し、3~4日毎に新しい培地に交換し、G418耐性株をクローニングした。得られたG418耐性株は200μg/ml G418 (GIBCO BRL)、10% FCSを含むDMEM培地で維持した。得られたG418耐性株のおのののチトクロームP450活性を以下に記載の方法で測定し活性の高い細胞株を測定し、高活性発現細胞を選択した。

【0019】

(1)CYP1A1およびCYP1A2発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

エトキシレゾルフィン (Molecular Probes) はDMSO (dimethyl sulfoxide)ジメチルスルフォキサイド) (和光純薬) で2mM になるように希釈した。次に、これを2% FCS (Bio Whittaker) を含むフェノールレッド不含DMEM培地 (GIBCO BRL) で500μM になるように希釈した。

CYP1A1 あるいは CYP1A2発現細胞を12ウェルプレート (Falcon) に播種し、コンフルエントになるまで CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した500μMエトキシレゾルフィンを500μl/ウェル添加した。暗所で37°Cで反応させた後、各ウェルから反応液を回収した。反応液300μlにメタノール (和光純薬) 1800μlを添加し、不溶性物質等を遠心除去した後、分光蛍光光度計にて、励起波長550nm 蛍光波長586nmの蛍光強度を測定し、生成したレゾルフィンを定量した。レゾルフィン (Molecular Probes) の標準物質は、Molecular Probesより購入したもの用いた。

得られたCYP1A1あるいはCYP1A2活性発現株のなかからCYP1A1高発現株としてHepc/1A1.4株をCYP1A2高発現株としてHepc/1A2.9株を各々得た。

【0020】

(2)CYP2A6 発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

クマリン（和光純薬）はメタノール（和光純薬）で50mMになるように希釈した。次に、これを2% FCS (Bio Whittaker)を含むフェノールレッド不含DMEM培地 (GIBCO BRL)で500μMになるように希釈した。

CYP2A6発現細胞を12ウェルプレート (Falcon)に播種し、コンフルエントになるまで CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した 500 μM クマリンを500 μl/ウェル添加した。37°Cで反応させた後、各ウェルから反応液を回収した。反応液を0.1M Tris-HCl (pH 7.4)で10倍に希釈し、分光蛍光光度計にて、励起波長390nm 蛍光波長440nmの蛍光強度を測定し、生成した7-ヒドロキシクマリンを定量した。7-ヒドロキシクマリンの標準物質は、Extrasyntheseより購入したもの用いた。

得られたCYP2A6活性発現株のなかからCYP2A6高発現株としてHepc/2A6.9株を得た。

【0021】

(3)CYP2B6発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

7-エトキシクマリン (Molecular Probes) はDMSO (和光純薬) で10mM になるように希釈した。次に、これを2% FCS (Bio Whittaker) を含むフェノールレッド不含DMEM培地 (GIBCO BRL)で500 μM になるように希釈した。

CYP2B6発現細胞を12ウェルプレート (Falcon) に播種し、コンフルエントになるまで CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した 500 μM 7-エトキシクマリンを500 μl/ウェル添加した。37°Cで反応させた後、各ウェルから反応液を回収した。反応液を0.1M Tris-HCl (pH 7.4)で10倍に希釈し、分光蛍光光度計 (日立分光蛍光光度計 F-2000) にて、励起波長390nm 蛍光波長440nmの蛍光強度を測定し、生成した7-ヒドロキシクマリンを定量した。7-ヒドロキシクマリンの標準物質は、Extrasyntheseより購入したもの用いた。

得られたCYP2B6活性発現株のなかからCYP2B6高発現株としてHepc/2B6.68株を

得た。

【0022】

(4) CYP2C8発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

タキソール (ULTRAFINE chemicals) はメタノール (和光純薬) で10mM になるように希釈した。次に、これを2% FCS (Bio Whittaker) を含むフェノールレッド不含DMEM培地 (GIBCO BRL) で30 μ M になるように希釈した。

CYP2C8発現細胞を12ウェルプレート (Falcon) に播種し、コンフルエントになるまで CO_2 インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した30 μ Mタキソールを500 μ l / ウェル添加して37°Cで反応させた。各ウェルから反応液を回収し、等量のアセトニトリル (和光純薬) を添加・混合後、不溶性物質を遠心除去した。これを、HPLCにて反応液中に生じた6 α -ヒドロキシパクリタキセルを定量した。

カラムは、Capcell Pak C18 AG120 (5 μ m、4.6mm ϕ x 250mm、資生堂) を用いた。移動相としては、40%アセトニトリル (HPLC用試薬、和光純薬) を用いた。反応液 40 μ l をインジェクションし、流速1.0ml/min、カラム温度40°Cで先に示した移動相を用いて溶出させた。タキソール および 6 α -ヒドロキシパクリタキセルは、230nm (吸光度) で検出した。標準物質として、10 μ Mタキソール および 5 μ M 6 α -ヒドロキシパクリタキセル (Gentest) 40 μ lをインジェクションした。

得られたCYP2C8活性発現株のなかからCYP2C8高発現株としてHepc/2C8.46株を得た。

【0023】

(5) CYP2C9発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

トルブタミド (Research Biochemicals International) はメタノール (和光純薬) で50mM になるように希釈した。次に、これを2% FCS (Bio Whittaker) を含むフェノールレッド不含DMEM培地 (GIBCO BRL) で500 μ M になるように希釈した。

CYP2C9発現細胞を12ウェルプレート (Falcon) に播種し、コンフルエントにな

るまで CO_2 インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した 50 μM トルブタミドを 500 μl / ウェル添加して 37°C で反応させた。各ウェルから反応液を回収し、等量のアセトニトリル（和光純薬）を添加・混合後、不溶性物質を遠心除去した。反応液中に生じたヒドロキシトルブタミドを HPLC にて定量した。

カラムは、 Inertsil ODS-2 (5 μm 、 4.6mm ϕ x 150mm、 GL Science) を用いた。移動相としては、 10mM Acetate Buffer (pH4.3) とアセトニトリル (HPLC用試薬、 和光純薬) を 72:28 v/v で混合したものを用いた。反応液 40 μl をインジェクションし、 流速 1.0ml/min、 カラム温度 40°C で先に示した移動相を用いて溶出させた。トルブタミドおよびヒドロキシトルブタミドは、 230nm (吸光度) で検出した。標準物質として、 100 μM トルブタミド および 10 μM ヒドロキシトルブタミド（住化分析センター） 40 μl をインジェクションした。

得られた CYP2C9 活性発現株のなかから CYP2C9 高発現株として Hepc/2C9.1 株を得た。

【0024】

(6) CYP2C19 発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

(S) メフェニトイン（住化分析センター）はメタノール（和光純薬）で 10mM になるように希釈した。次に、これを 2%FCS (Bio Whittaker) を含むフェノールレッド不含DMEM 培地 (GIBCO BRL) で 100 μM になるように希釈した。

CYP2C19 発現細胞を 12 ウェルプレート (Falcon) に播種し、コンフルエントになるまで CO_2 インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM 培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した 10 μM (S) メフェニトインを 500 μl / ウェル添加して 37°C で反応させた。各ウェルから反応液を回収し、等量のアセトニトリル（和光純薬）を添加・混合後、不溶性物質を遠心除去した。これを、 HPLC にて反応液中に生じた 4'-ヒドロキシメフェニトインを定量した。

カラムは、 Capcell Pak C18 AG120 (5 μm 、 4.6mm ϕ x 250mm、 資生堂) を用いた。移動相としては、 0.05M KH_2PO_4 (pH4.0) とアセトニトリル (HPLC用試薬、 和光

純薬) を74:26 v/vで混合したものを用いた。反応液 40 μl をインジェクションし、流速0.8ml/min、カラム温度40℃で先に示した移動相を用いて溶出させた。(S)メフェニトインおよび4'-ヒドロキシメフェニトインは、204nm (吸光度) で検出した。標準物質として、50 μM (S)メフェニトイン および 5 μM 4'-ヒドロキシメフェニトイン (住化分析センター) 40 μl をインジェクションした。

得られたCYP2C19活性発現株のなかからCYP2C19高発現株としてHepc/2C19.12株を得た。

【0025】

(7)CYP2D6発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

ブフラロール (住化分析センター) は蒸留水で20mMになるように希釈した。次に、これを2% FCS (Bio Whittaker) を含むフェノールレッド不含DMEM培地 (GIBCO BRL)で200 μM になるように希釈した。

CYP2D6発現細胞を12ウェルプレート (Falcon)に播種し、コンフルエントになるまで CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した200 μMブフラロールを500 μl/ウェル添加して37℃で反応させた。各ウェルから反応液を回収し、HPLCにて反応液中に生じた1'-ヒドロキシブフラロールを定量した。

カラムは、Inertsil ODS(5 μm、4.6mm φ x 250mm、GL Science)を用いた。移動相としては、1 mM過塩素酸 (和光純薬) を含む30%アセトニトリル溶液 (HPLC用試薬、和光純薬) を用いた。反応液を蒸留水で100倍に希釈し、そのうちの 40 μl をインジェクションし、流速1.0 ml/min、カラム温度50℃で先に示した移動相を用いて溶出させた。ブフラロール および ヒドロキシブフラロールは、励起波長252nm 蛍光波長302nmで検出した。標準物質として、100pMブフラロールおよび10pM 1'-ヒドロキシブフラロール (住化分析センター) 40 μl をインジェクションした。

得られたCYP2D6活性発現株のなかからCYP2D6高発現株としてHepc/2D6.39株を得た。

【0026】

(8) CYP2E1発現細胞 の活性の測定と高活性発現細胞の選択

パラニトロフェノール（和光純薬）はDMSO（和光純薬）で2mMになるように希釈した。次に、これを2% FCS (Bio Whittaker) を含むフェノールレッド不含DMEM培地 (GIBCO BRL) で500 μMになるように希釈した。

2E1発現細胞を12ウェルプレート (Falcon) に播種し、コンフルエントになるまで CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した500 μMパラニトロフェノールを500 μl/ウェル添加した。37°Cで反応させた後、各ウェルから反応液を回収した。反応液100 μlに2N NaOH（和光純薬）50 μlを添加し、不溶性物質等を遠心除去した後、540nm～620nmの吸収を測定し、生成した4-ニトロカテコールを定量した。4-ニトロカテコールの標準物質は、和光純薬より購入したもの用いた。

得られたCYP2E1活性発現株のなかからCYP2E1高発現株としてHepc/2E1.3-8株を得た。

【0027】

(9) CYP3A4発現細胞 の活性の測定と高活性発現細胞の選択

テストステロン（和光純薬）はメタノール（和光純薬）で10mMになるように希釈した。次に、これを2% FCS (Bio Whittaker) を含む、フェノールレッド不含DMEM培地 (GIBCO BRL) で100 μMになるように希釈した。

CYP3A4発現細胞を12ウェルプレート (Falcon) に播種し、コンフルエントになるまで CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した100 μM テストステロンを500 μl/ウェル添加して37°Cで反応させた。各ウェルから反応液を回収し、等量のアセトニトリル（和光純薬）を添加・混合後、不溶性物質を遠心除去した。これを、HPLCにて反応液中に生じた6β-ヒドロキシテストステロンを定量した。

カラムは、Capcell Pak C18 AG120 (5 μm, 4.6mm φ × 250mm、資生堂) を用いた。A液として、40% メタノール (HPLC用試薬、和光純薬) 、3.5% アセトニトリ

ル溶液（HPLC用試薬、和光純薬）を、B液として40% メタノール、20% アセトニトリル溶液を用いた。0～20分まではB液の0～100% の直線的なグラディエント、20～30分はB液100%、それ以後はA液100%となるようなプログラムを作成した。反応液 40 μ l をインジェクションし、流速1.0ml/min、カラム温度40℃で先に示した移動相を用いて溶出させた。テストステロン および 6β -ヒドロキシテストステロンは、254nm（吸光度）で検出した。標準物質として、50 μ M テストステロン および 5 μ M 6β -ヒドロキシテストステロン（住化分析センター） 40 μ l をインジェクションした。

得られたCYP3A4活性発現株のなかからCYP3A4高発現株としてHepc/3A4.5株を得た。

【0028】

実施例3：チトクロームP450高発現株の速度論的解析

実施例2で得られた各チトクロームP450高活性発現株に、種々の濃度の基質を実施例2記載の酵素活性測定法に従って反応させた。ラインウェーバー・バークプロットをとり、そのX軸 および Y軸切片から、Km値 および Vmax値を求めた。結果を表1に示した。

【表1】

CYP分子種	形質転換株	酵素活性	Km(μM)	速度定数 Vmax(pmol/min/mg)
CYP1A1	Hepc1A1.4	7-エトキシレソルフィンO-脱エチル化活性	0.25	56
CYP1A2	Hepc1A2.9	7-エトキシレソルフィンO-脱エチル化活性	0.72	1.6
CYP2A6	Hepc2A6L.9	クマリン7-ヒドキシ活性	11.1	412
CYP2B6	Hepc2B6.69	7-エトキシクマリンO-脱エチル化活性	81	80
CYP2C8	Hepc2C8.46	タキソール6-ヒドロキシン活性	7.4	0.009
CYP2C9	Hepc2C9.1	トルブタミド4-ヒドロキシ活性	77	23
CYP2C19	Hepc2C19.12	(S)-メフェニトイン4-ヒドロキシン活性	8.26	140
CYP2D6	Hepc2D6.39	プロラロール1-ヒドロキシ活性	17	14
CYP2E1	Hepc2E1.3-8	p-二トロフェノールヒドロキシ活性	88	120
CYP3A4	Hepc3A4.5	テストステロン6β-ヒドロキシ活性	96	71

表1 P450発現株の各基質に対するKm, Vmax

【0029】

実施例4：アセトアミノフェンのCYP2E1発現細胞による代謝活性化と細胞毒性の発現

実験方法

1. MTTアッセイ

HepG2あるいはCYP2E1発現細胞 (Hepc/2E1.3-8) 細胞 (4×10^5 cells/ml) は、5% FCS を含むDMEM培地で所定の濃度に希釈したアセトアミノフェン (和光純薬) とともにCO₂ インキュベーター内で培養した。グルタチオン抱合を停止させる実験では、ここにL-Buthionine [S,R]-Sulfoximine (BSO、Sigma) を最終濃度100 μM になるように添加した。4日間培養した後、各ウェルにPBS (Flow) で1mg/mlに調製した 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT、Sigma) 溶液 20 μl を添加して37°Cで3時間インキュベートした。次いで、各ウェルに10% SDS、0.01N HCl 溶液 100 μl を添加して37°Cで一晩インキュベートした後、 590nm の吸収を測定した。結果を図1に示す。

2. LDH (lactate dehydrogenase 乳酸脱水素酵素) 漏出の測定

MTTアッセイ実施時と同じプレートデザインで2枚ずつプレートを用意した（培養上清中のLDH活性測定用と培養上清中のLDH活性 + 細胞中のLDH活性 测定用）。3日間CO₂インキュベーター内で培養後、1枚のプレート（培養上清中のLDH活性測定用）の各ウェルから10 μlの培養上清を採取して別の96ウェルプレートに添加し、さらに蒸留水40 μlを添加した。一方、他方のプレート（培養上清中のLDH活性 + 細胞中のLDH活性測定用）の各ウェルに10 μlの10% Triton X100 （和光純薬）を添加・攪拌し、37°Cで45分インキュベートした。1500 rpm 5分間遠心後、各ウェルから10 μlの培養上清を採取して別の96ウェルプレートに添加し、さらに蒸留水40 μlを添加した。これらのプレートの各ウェルのLDH活性をCytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega) にて測定した。吸光度の測定には、マルチスキャンMS-UVを用いた。培養上清中のLDH活性 / (培養上清中のLDH活性 + 細胞中のLDH活性) をLDH漏出率とした。結果を図2に示す。

結果（図1、図2）

アセトアミノフェンが大量に存在すると、硫酸抱合の律速因子である活性硫酸の枯渢が起こる。グルクロン酸抱合は用量が大きいが反応速度に限界があるため、P450によってN水酸化がおこる。N水酸化体から生成する活性中間体 NアセチルPベンゾキノンイミンは、通常グルタチオン抱合により解毒される。しかし、グルタチオンが枯渢すると、この活性中間体が肝臓の高分子と共有結合して肝細胞の壞死をおこすことが知られている(M.J.J. Ronis ほか Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects 211-240ページ、監修C. Ioannides ほか CRC Press 1996年)。

アセトアミノフェンは、HepG2 および Hepc/2E1.3-8細胞からLDHをわずかに漏出させた。ここにBSOを共存させて細胞内のグルタチオンを枯渢させると、Hepc/2E1.3-8細胞においてはアセトアミノフェンに対する感受性が約4倍増加して、より低濃度で濃度依存的にLDHを漏出させた。HepG2 ではBSOの共存効果は認められなかった(図2)。一方、MTT法でもアセトアミノフェンはHepG2 および Hepc/2E1.3-8細胞のMTT活性をわずかに減少させた。ここにBSOを共存させると、Hepc/2E1.3-8細胞においてアセトアミノフェンに対する感受性が増加して、より低濃度で濃度依存的なMTT活性の減少が認められた(図1)。Hepc/2E1.3-8細胞が発現しているCYP2E1活性によってアセトアミノフェンは代謝されるが、代謝産物はグルタチオン抱合によって解毒される。ところが、BSO を作用させてグルタチオンを枯渢させると、生じた代謝中間体によって細胞毒性が発揮されたと考えられる。Hepc/2E1.3-8細胞はCYP2E1活性を持っているだけでなく、グルタチオントランスフェラーゼ活性も有していることが示される。

【0030】

実施例5：ベンズアントラセンのCYP1A1発現細胞による代謝活性化と細胞毒性の発現

実験方法

CYP1A1発現細胞 (Hepc/1A1.4) (4×10^5 cells/ml) は、5% FCS を含むDMEM培地で所定の濃度に希釈したベンズアントラセン (Sigma)とともに5% FCS を含むDMEM培地でCO₂ インキュベーター内で培養した。4日間培養した後、各ウェルにPBS (Flow) で1mg/mlに調製した MTT (Sigma)溶液 20μl を添加して37°Cで3時間

インキュベートした。次いで、各ウェルに10% SDS、0.01N HCl 溶液 100 μ l を添加して37℃で一晩インキュベートした後、590nm の吸収を測定した。結果を図3に示す。

結果（図3）

ベンズアントラセンは、CYP1A1 活性によって代謝され、生じた代謝中間体によって細胞毒性、発ガン性、突然変異誘発することが知られている（K. Kawajiri ほか Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects 77-97ページ、監修C. Ioannides ほか CRC Press 1996年）。HepG2に比べてHepc/1A1.4細胞においてベンズアントラセンの濃度依存的に強いMTT 活性の減少が認められた。Hepc/1A1.4細胞が発現しているCYP1A1 活性によってベンズアントラセンが代謝され、生じた代謝中間体によって細胞毒性が発揮されたを示す。

【0031】

実施例6：シクロフォスファミドのCYP2B6発現細胞による代謝活性化と細胞毒性の発現

実験方法

1. MTTアッセイ

CYP2B6発現細胞 (Hepc/2B6.68) (4×10^5 cells/ml) は、5% FCS を含むDMEM培地で所定の濃度に希釈したシクロフォスファミド (Sigma)とともに5% FCSを含むDMEM培地でCO₂ インキュベーター内で培養した。5日間培養した後、各ウェルにPBS (Flow) で1mg/mlに調製した MTT (Sigma)溶液 20 μ l を添加して37℃で3時間インキュベートした。次いで、各ウェルに10% SDS、0.01N HCl 溶液 100 μ l を添加して37℃で一晩インキュベートした後、590nm の吸収を測定した。結果を図4に示す。

2. LDH漏出の測定

MTTアッセイ実施時と同じプレートデザインで2枚ずつプレートを用意した（培養上清中のLDH活性測定用と培養上清中のLDH活性 + 細胞中のLDH活性測定用）。4日間CO₂ インキュベーター内で培養後、1枚のプレート（培養上清中のLDH活性測定用）の各ウェルから10 μ lの培養上清を採取して別の96ウェルプレートに添加し、さらに蒸留水40 μ lを添加した。一方、他方のプレート（培養上清中の

LDH活性 + 細胞中のLDH活性測定用) の各ウェルに10 μ lの10% Triton X100 を添加・攪拌し、37°Cで45分インキュベートした。1500rpm 5分間遠心後、各ウェルから10 μ lの培養上清を採取して別の96ウェルプレートに添加し、さらに蒸留水40 μ lを添加した。これらのプレートの各ウェルのLDH活性をCytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega) にて測定した。吸光度の測定には、マルチスキャンMS-UVを用いた。培養上清中のLDH活性 / (培養上清中のLDH活性 + 細胞中のLDH活性) をLDH漏出率とした。結果を図5に示す。

結果(図4、5)

シクロフォスファミドは4位が水酸化された後、非酵素的な分解によって生成したホスホラミドやアクロレインがアルキル化剤として作用し、肝細胞内の高分子成分と共有結合が引き金となって肝細胞傷害を引き起こすと考えられている(K.H.Thomas ほかCancer. research 53巻 5629-5637ページ1993年)。シクロフォスファミドは、Hepc/2B6.68細胞において2mMまでの濃度で濃度依存的にLDHを漏出させ、それ以後の濃度でプラトーに達した。シクロフォスファミドはHepG2においても若干の細胞毒性が認められた(図4)。一方、MTT法でもHepc/2B6.68細胞においてシクロフォスファミドの濃度依存的にMTT活性の減少が認められた(図5)。Hepc/2B6.68細胞が発現しているCYP2B6活性によってシクロフォスファミドが代謝され、生じた代謝中間体による細胞毒性が示された。

【0032】

実施例7：CYP3A4活性の阻害の解析

実験方法

12穴マイクロプレートに Hepc/3A4.5 細胞を播種し、コンフルエントになるまで培養した。フェノールレッド不含 DMEM 培地で2回洗浄後、500 μ l の 2% FCS を含むフェノールレッド不含 DMEM 培地で希釈した種々の濃度のケトコナゾール (Biomol Research Lab.) を添加して 37°C で4 時間インキュベーションした。フェノールレッド不含 DMEM 培地で 2 回洗浄後、500 μ l の 2% FCS を含むフェノールレッド不含 DMEM 培地で希釈した最終濃度 100 μ M のテストステロンを添加した。37°C で 1 時間インキュベーションし、上清を回収した。等量のアセトニトリルを添加・混合後、不溶性物質を遠心除去したものを試料と

した。得られた試料は、実施例2の(9)に示した方法でHPLCを用いて 6β -ヒドロキシテストステロンを定量した。

実験結果は薬物無添加時の 6β -ヒドロキシテストステロン生成量を100%とした相対値で示した(図6)。

実験結果(図6)

ケトコナゾールは、強いCYP3A4阻害剤として知られている(S.J. BaldwinほかXenobiotica 25巻 261-270ページ1995年)。ケトコナゾールの濃度に依存してHepc/3A4.5細胞におけるCYP3A4活性(テストステロン 6β -水酸化活性)は阻害された(図6)。ケトコナゾールのIC50は、 $0.3 \mu M$ 以下であった。

【0033】

実施例8:CYP2E1活性誘導の解析

実験方法

Hepc/2E1.3-8細胞(5×10^5 cells/ml)は、5%FCSを含むDMEM培地で所定の濃度に希釈したエタノール、DMSO(ジメチルスルフォキシド)(和光純薬)とともに12穴マイクロプレートに播種し、CO₂インキュベーター内で3日間培養した。培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、 $500 \mu M$ パラニトロフェノールを $500 \mu l$ /ウェル添加した。37℃で反応させた後、各ウェルから反応液を回収した。反応液 $100 \mu l$ に2N NaOH(和光純薬) $50 \mu l$ を添加し、不溶性物質等を遠心除去した後、マルチスキャンMS-UV(ラボシステムズ)にて、540nm～620nmの吸収を測定し、生成した4-ニトロカテコールを定量した。

実験結果(図7)

エタノール、DMSO(ジメチルスルフォキシド)添加によりにより酵素活性が上昇し細胞内CYP2E1が誘導を受けることが示されており(M.J.J. Ronisほか Cytochrome P450 Metabolic and Toxicological Aspects 211-239ページ、監修C. Ioannidesほか CRC Press 1996年)。本実施例においてもこのことが示された。

【0034】

【発明の効果】

本発明のヒト型チトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株は、(a)生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素、(b)生体異物および／または内在性基質代謝経路、(c)生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造、(d)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害、(e)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進、(f)生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性、(g)生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性、(h)生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性、(i)生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性、(j)生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性、または(k)肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析、生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製などのために有用である。

【0035】

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例4で示されたアセトアミノフェンの細胞毒性発現に関するMTT試験の結果を示す。

【図2】 実施例4で示されたアセトアミノフェンの細胞毒性発現に関するLDH漏出試験の結果を示す。

【図3】 実施例5で示されたベンズアントラセンの細胞毒性発現に関する試験の結果を示す。

【図4】 実施例6で示されたシクロフォスファミドの細胞毒性発現に関するMTT試験の結果を示す。

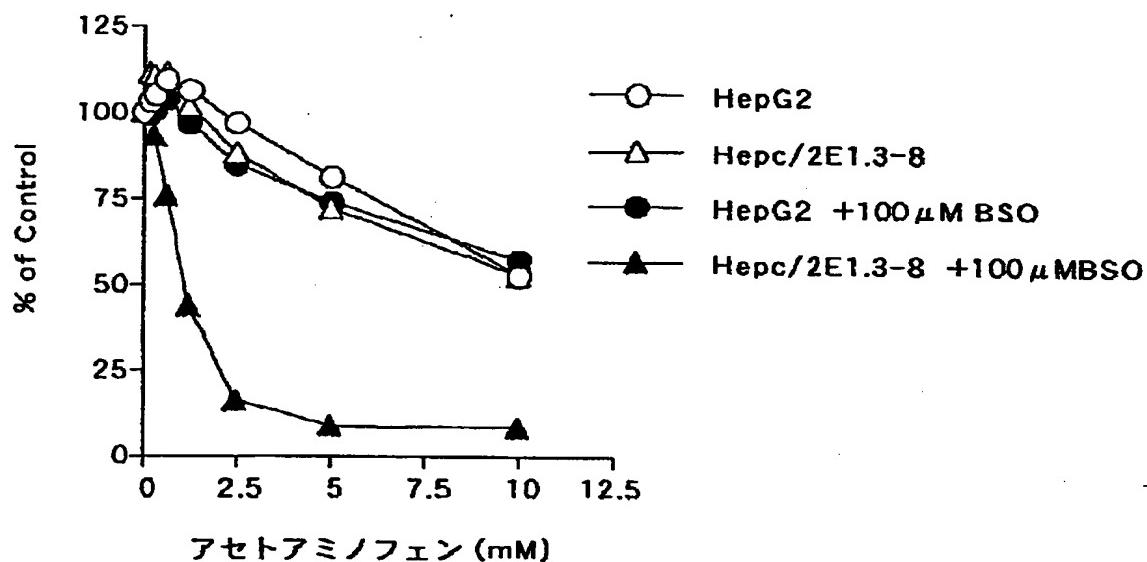
【図5】 実施例6で示されたシクロフォスファミドの細胞毒性発現に関するLDH漏出試験の結果を示す。

【図6】 実施例7で示されたケトコナゾールのCYP3A4活性阻害に関する試験の結果を示す。

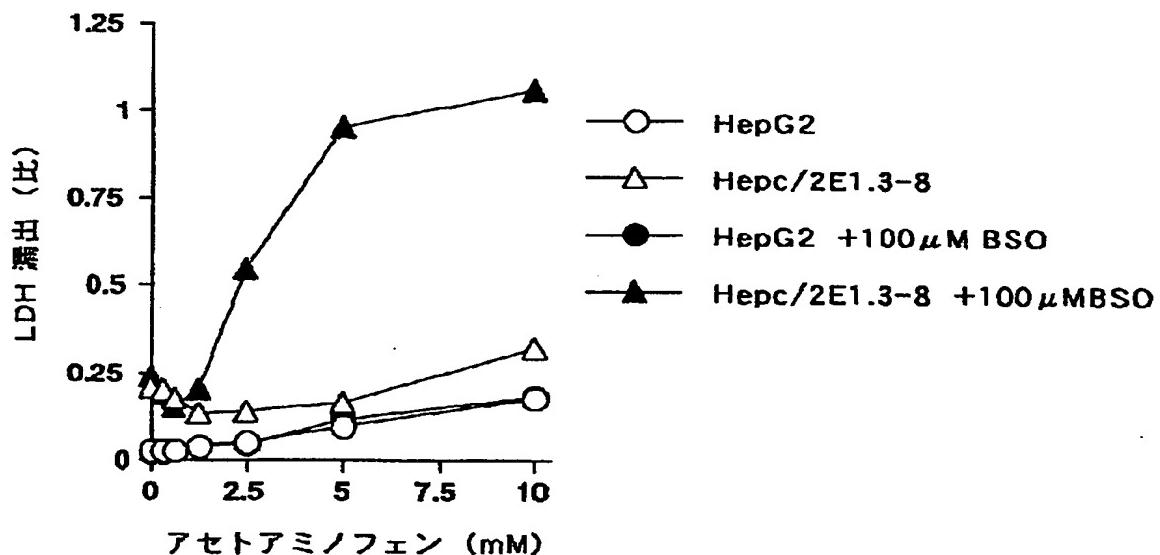
【図7】 実施例8で示されたCYP2E1活性誘導に関する試験の結果を示す。

【書類名】図面

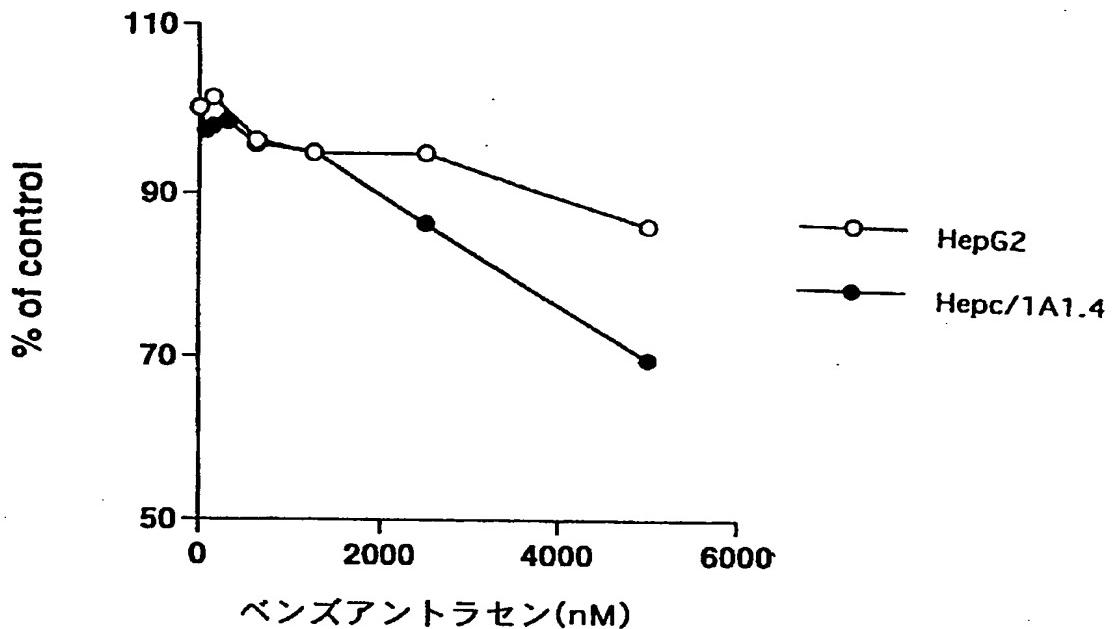
【図1】



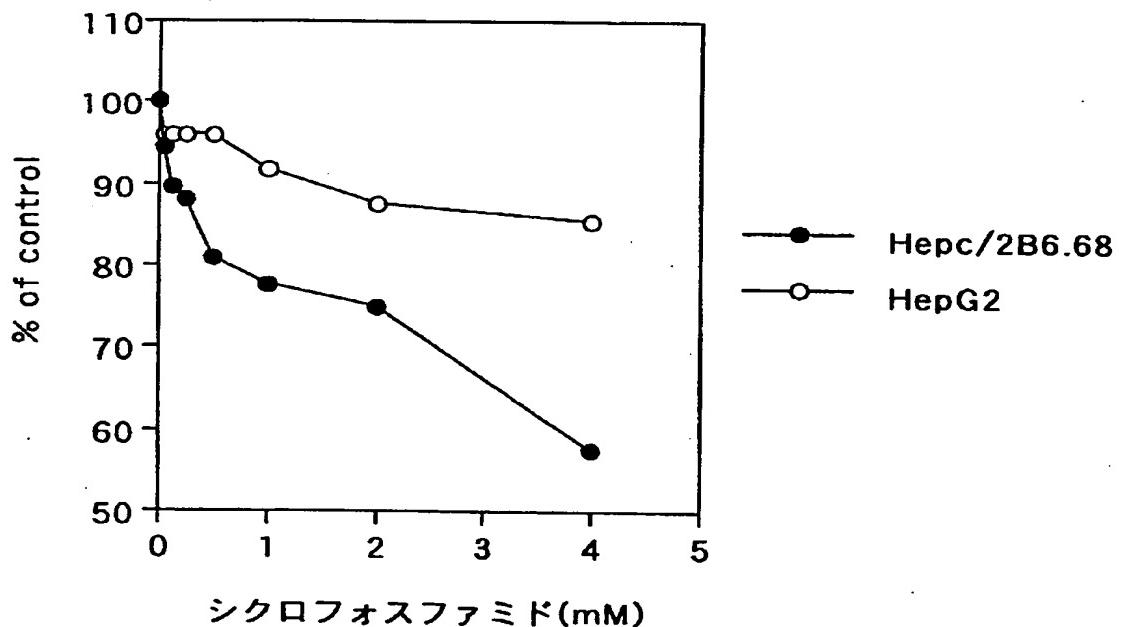
【図2】



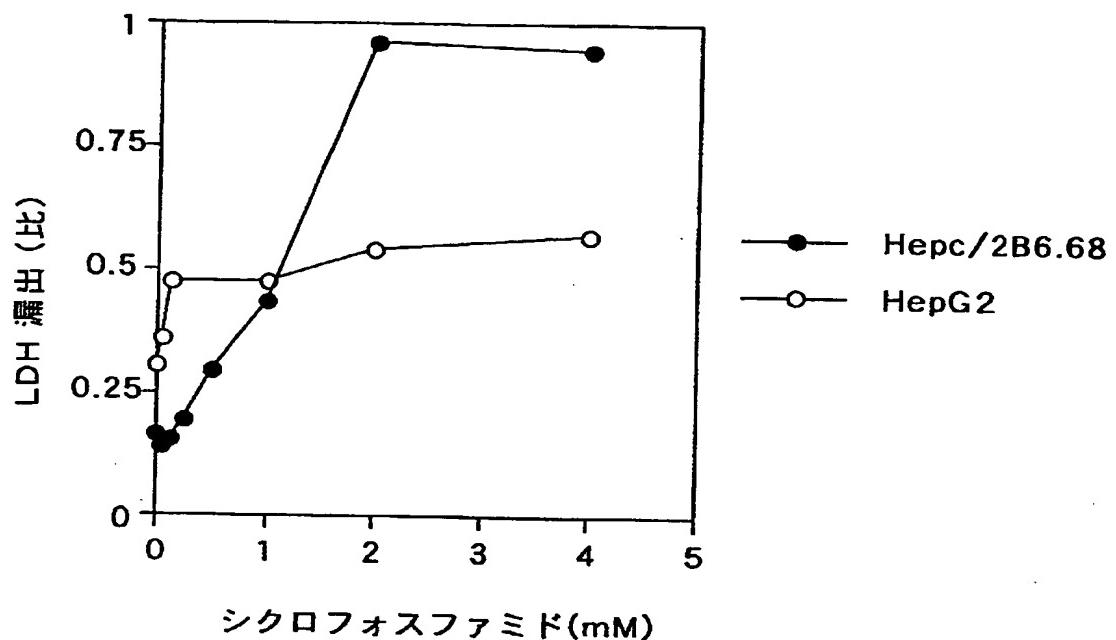
【図3】



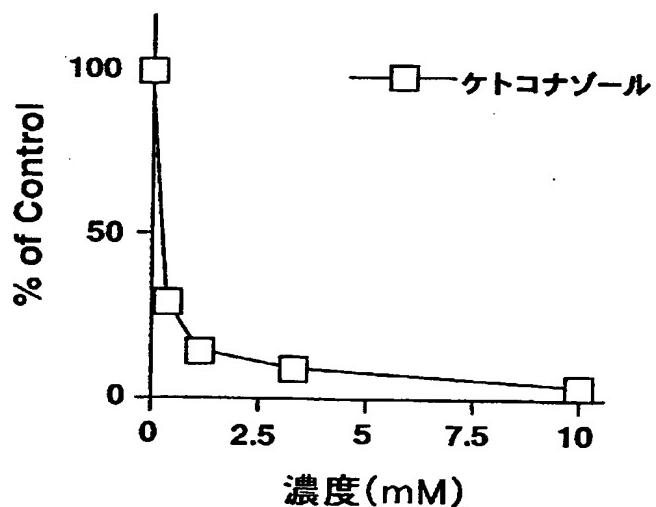
【図4】



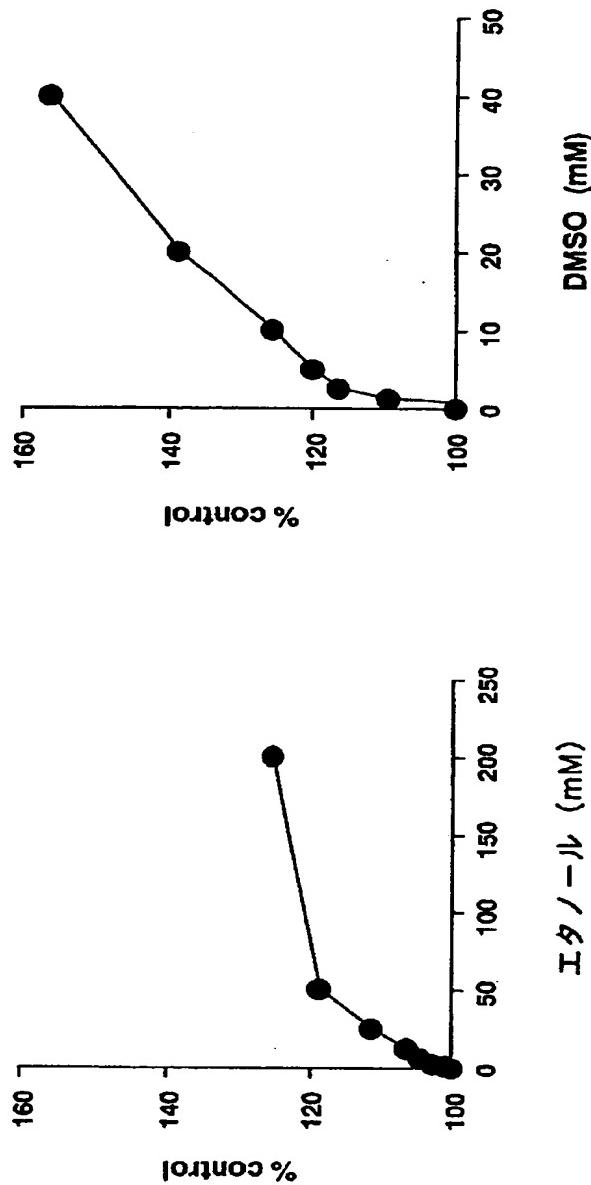
【図5】



【図6】



【図7】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】ヒト肝臓由来の培養細胞株を宿主とし、多数のヒト型チトクロームP450を安定に発現している細胞株を提供する。

【解決手段】ヒト型チトクロームP450を安定に発現するヒト肝由来の培養細胞株の提供。

【効果】本発明のヒト肝臓に由来する培養細胞株は、ヒト型チトクロームP450 CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 を安定に発現するため、生体異物およびまたは内在性基質代謝に関与する酵素の解析などに有用である。

【選択図】なし

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成11年 6月24日
【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第120747号

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人
【識別番号】 000002934
【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社
【代表者】 武田 國男

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人
【住所又は居所】 岡山県岡山市宿400-1
【氏名又は名称】 難波 正義

【代理人】

【識別番号】 100073955

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 提出物件の目録
【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 委任状 1

19911700013



管理番号 A 99089

委任状

平成11年4月27日

私は、識別番号 100073955 朝日奈忠夫および識別番号 100110456 内山務氏をもって代理人とし、下記事項を委任いたします。

記

1. 平成11年特許願第120747号に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更および拒絶査定不服審判の請求並びに取下げ
2. この特許出願に基づく特許法第41条第1項の規定による優先権主張並びにその取下げ
3. 上記出願の分割出願に関する一切の件並びに本件に関する上記事項一切
4. 上記出願に関する優先審査若しくは早期審査に関する事情説明の提出、刊行物等の提出
5. 上記各項に関する行政不服審査法に基づく諸手続きの遂行
6. 上記事項を処理するための復代理人の選任およびその復代理人の解任

岡山県岡山市宿400-1

難波正義

認定・付加情報

特許出願の番号 平成11年 特許願 第120747号
受付番号 19911700013
書類名 手続補正書
担当官 小菅 博 2143
作成日 平成11年 8月 6日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

氏 名 武田薬品工業株式会社

出願人履歴情報

識別番号 [598056641]

1. 変更年月日 1998年 4月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 岡山県岡山市宿400-1
氏 名 難波 正義